

PTO 02-3107

French Patent No. 2 760 192

PROCEDURE FOR OBTAINING NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES,  
SUBSTANCES SO OBTAINED AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM

Gilles Gutierrez et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
WASHINGTON, D.C. JUNE 2002  
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

FRENCH REPUBLIC  
NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY  
PATENT NO. 2 760 192 A1

Int. Cl.<sup>6</sup>: A 61 K 35/80  
A 61 K 7/48

Filing No.: 97 02506

Filing Date: March 3, 1997

Date of Public Access  
to the Application: September 4, 1998 Bulletin 98/36

PROCEDURE FOR OBTAINING NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES,  
SUBSTANCES SO OBTAINED AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM  
[Procédé d'obtention de nouvelles substances biologiquement actives, les substances ainsi  
obtenus et les compositions en refermant]

Inventors: Gilles Gutierrez et al.

Applicant: INVOVAT – TN

The present invention has as a goal a procedure for obtaining new biologically active substances marine in origin, the biologically active substances so obtained and the compositions containing them. /1\*

These new biologically active substances are extracted from plants of the family of the Dictyotales.

The compositions of the present invention are intended for inhibiting the cell death of eukaryotic cells by decreasing the synthesis of the BAX protein. These compositions thus demonstrate an anti-apoptotic action by decreasing synthesis of the BAX protein.

---

\* [The number in the margin indicates pagination of the foreign text.]

The discovery of the phenomenon of programmed cell death, although not recent, has made significant advance in recent years as a result of immunology and molecular biology which put antibodies and antigens at the disposal of researchers documenting the different participants in apoptosis. Today, the principal steps of apoptosis are relatively well known. Most of the research studies on stopping the programming of death are all conducted by genome amplification of genes coding for the peptide sequences involved in the development of apoptosis.

Apoptosis is controlled by two families of molecules that are protein in nature and called BAX and Bcl2. These molecules are only active when they are coupled. The heterodimer pair: proteins originating from two different families such as BAX-Bcl2 cancel the programming of death. The homodimer pair of the bax-bax type activates it. As a result, if the synthesis of BAX is decreased, the life of the cells will be increased.

The biologically active substances of the present invention participate in controlling the synthesis of BAX throughout life and by decreasing this synthesis after an injury.

Physiological apoptosis is essential for our survival. It participates in our morphogenesis and it is one of the major phenomena of the development of our brain. In insects, apoptosis is one of the major biological phenomena which start metamorphosis; in other animals it plays a dominant role in molting. In mammals and other species it controls the immune phenomena.

/2

The plants from which the biologically active substances of the invention are extracted are Pheophycees, class Fucophyceae, order Dictyotales, family Dictyotaceae. Only some genera belong to the family of the Dictyotales; they are Padina, Zonaria or Dictyota. The genus Padina groups together the most frequent species. By way of example, it is possible to find on the Mediterranean shore the species pavonica, boyana (*P. tenuis*), boergesenii, on the Pacific shore (not including the species already mentioned): arborescens, australis, boryana, cualens, commersonii, concrescens, crasse, durvillei, elegans, fernandeziana, fraseri, gymnospora, likewise on the shores of the Atlantic Ocean: glabra, haitensis, distromatica, dubia. There are also species typical of the Indian Ocean. One of the characteristics of these plants is to fix on their thallus a layer of calcium carbonate of the aragonite or orthorhombic type on the surface of the fronds. This characteristic is obtained by X-ray diffraction of the powder obtained with these plants. The X-ray diffraction shows that the powder from these plants presents peaks with special intensity at 2 $\theta$  angles, characteristic of aragonite.

Another characteristic of these plants is their ability to survive under difficult conditions by preserving their own vegetative life and not using sporulation. Mechanisms identical to this plant are not found in our cells. In fact, these algae were present at the beginning of the building of our evolutionary tree.

The present invention concerns the procedure for obtaining biologically active substances extracted from plants of the family of the Dictyotales.

/3

Firstly, the plant from the family of the Dictyotales is subjected to a drying after collecting, protected from light if possible, to keep its pharmacological properties intact.

Drying of the ground up or crude plants is carried out by ventilation without heating and thus a plant material is obtained that is deep maroon in color on which the white streaks of calcium carbonate contrast sharply.

Another method, although less economical, also gives satisfaction: it consists of draining the plants well, then drying them under air vacuum. Lyophilization of the plant, ground up or not, advantageously enables an anhydrous product to be obtained.

These last two techniques give a material deep brown green in color, very fragile and easily reduced to powder, which facilitates the extraction by a solvent to obtain biologically active substances of the invention.

The importance of a well dried plant is to obtain a plant material which stores well (free of moisture) and from which it will be possible to extract the active substance(s), stabilized or not, without being hampered by the presence of a polar solvent. Furthermore, the completely dried plants are easier to reduce into powder.

The procedure for obtaining biologically active substances is characterized in that a plant from the family of the Dictyotales is subjected to drying and/or lyophilization, to grinding up, followed by one or more strippings of the plant material with an organic solvent chosen from the group formed by alkanols (ethanol...), ketones (acetone...), short-chain alkanes (pentane, hexane, heptane..), cycloalkanes (cyclohexane...), halogenated solvents (chloroform, dichloromethane...), aromatic solvents, esters (ethyl acetate...), ethers and the like, to obtain an organic extract from the plant, the organic extract is dried by evaporation of the solvent, [and] the dry organic extract is purified by one or more steps of purification carried out successively by liquid/liquid contacting, by low-pressure or high-pressure column chromatography, [and] by high performance liquid chromatography to obtain one or more active fractions of plants from the family of the Dictyotales demonstrating an anti-apoptotic action by decreasing synthesis by the cells of proteins related to those of the BAX family.

/4

The organic solvents may be used alone or in combination. Generally, organic solvents that are miscible in water can be used, as well as all solvents capable of extracting the active substances from the fronds of the plant. The solvents will preferably be chosen from volatile solvents since biologically active substances are desired to be obtained that are free of solvent.

The organic solvent will preferably be acetone or ethanol.

During maceration very variable ratios of dry material relative to the solvent are used with good results. The volumes used for the same quantity of dry material vary from

1 to 50. Likewise, the contact time between the organic solvent and the plant matter can vary from 12 h to 5 days.

In the present case, the plant from the family of the Dictyotales once dried and/or lyophilized and ground, is subjected to one or more strippings by contacting the plant with the acetone for 4 to 5 days and in proportions of 1 g of dry plant matter to 5 mL of acetone.

The acetone extract obtained is dried by evaporation of the solvent, then purified by purification steps defined below.

The first purification step is carried out by liquid/liquid contacting. The residue or dry acetone extract is taken up by a methanol/water mixture which is contacted with hexane. Secondly, the water-methanol phase is contacted with ether after concentration and dilution in water.

In this way, the final ether phase is biologically active.

The second purification step is carried out by low-pressure column chromatography. The support used is a gel of the Sephadex LH20® type.

/5

Elution is carried out by a chloroform/methanol gradient. The biologically active fraction is eluted in chloroform/methanol in proportions of 97/3 volume by volume. During rinsing of the column with a 70/30 chloroform/methanol mixture a second residual fraction is eluted.

The following purification step takes place by semipreparative high performance liquid chromatography (HPLC). The dimensions of the column are 250 mm length and 10 mm diameter. The support used is a diol grafted silica and the eluant is a 95/5 hexane/isopropanol mixture. The flow rate is 8 mL/min. The active fractions are eluted between 0 and 20 min, 25 and 35 min and/or 40 and 50 min. The other fractions are thrown out or are used for other purposes.

Other purification steps are also conceivable.

At the end of these purification steps, a biologically active fraction is obtained that is formed of one or more substances which cause a decrease in the synthesis of BAX during contacting with the cells.

Thus, the new biologically active substances of plants from the family of the Dictyotales are characterized in that, when the stripping has been carried out in acetone, they present retention times in semipreparative high performance liquid chromatography on the diol grafted silica support and with a 95/5 hexane/isopropanol eluant, between 0 and 20 min, 25 and 35 min and/or 40 and 50 min.

Next, different analytical methods are carried out (UV, IR, NMR spectra, thin-layer chromatography) which enable the characterization of the biologically active substance(s), extracted under these conditions from plants of the family of the Dictyotales.

The present invention also has as a goal new biologically active substances likely to be so obtained, extracted from plants from the family of the Dictyotales.

These substances present an anti-apoptotic action by decrease of the synthesis of the proteins related to those of the BAX family, in particular in the presence of free radicals or elevation of temperature.

/6

Thus the biologically active substances make possible the stabilization of the phenomenon of cell death induced in cell strains, prolongation of cell life and protection of "cell capital."

The biologically active substances according to the invention, extracted from plants from the family of the Dictyotales, demonstrate very interesting pharmacological properties, and from this fact find use in therapeutics, cosmetics, the food industry and human and veterinary health foods.

The biologically active substances according to the invention that are likely to be obtained according to the procedure of the invention are used with a view to production of composition or depot formulations designed to prevent and/or to treat disorders involving an increased synthesis of the BAX protein.

The present invention also concerns pharmaceutical, cosmetic and/or dietary compositions presenting an anti-apoptotic action by decrease of the synthesis of the BAX protein, characterized in that they contain by way of active ingredient one or more biologically active substances likely to be obtained according to the procedure of the invention, in combination or in mixture with an excipient or an inert vehicle, nontoxic, [and] appropriate for proposed use, and possibly one or more active ingredients with complementary action.

The pharmaceutical, cosmetic and/or dietary compositions according to the invention are designed for the administration by the digestive, parenteral, percutaneous or topical route. Therefore, the compositions are presented in the form of bare or boated tablets, sugar-coated pills, capsules, pills tablets, packets, syrups, powders to be ingested or for external use; solutions or suspensions packaged in ampoules; creams, gels or ointments; [and] solutions for percutaneous use in a penetrating polar solvent.

The present invention also concerns the depot formulations presenting an anti-apoptotic action by decreasing synthesis of the BAX protein characterized in that they contain by way of active ingredient one or more biologically active substances likely to be obtained according to the procedure of the invention, in combination or in mixture with an excipient or an inert vehicle, nontoxic, [and] not very resorbable, and possibly one or more active ingredients with complementary action.

/7

The following results and examples illustrate the invention. They do not limit it in any way.

### Example 1

Study of the inhibitory activity of the synthesis of the BAX protein by substances extracted from plants of the family of the Dictyotales.

The criterion for activity is the inhibition of the synthesis of the BAX protein.

The measurement of the BAX synthesized by the keratinocytes is carried out by an immunoabsorption method called ELISA sandwich.

The cells are prepared according to the technique of Germain et al. from samples of healthy skin originating from cosmetic surgery. After removal of the fatty tissue, the skin is cut into small fragments of 2 mm x 2 mm which are incubated in a thermolysin solution (500 µg/mL of HEPES buffer) at 37°C for 2 h. The epidermis is then easily separated from the dermis with the aid of very fine sterile forceps. The flaps of epidermis so detached are incubated in a solution of trypsin (0.05% in HBSS buffer)-EDTA (0.1% in HBSS buffer) at 37°C for 30 min to dissociate the keratinocytes. After two rinsings in the HBSS buffer, the keratinocyte cells are counted with the aid of a Coulter counter (Coultronics) then cultured in the KMK medium (SIGMA).

### Experimental protocol:

The freshly isolated keratinocytes are seeded at a rate of one million per dish in the KMK culture medium. The keratinocyte cultures are treated the evening before with 1% ethanol solution containing (test dishes) or not (control dishes) the active ingredient.

The following day, the culture dishes are put in a water bath at a temperature of 43° for 30 min. They are next transferred into the CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 2 h again. The cells are then lysed by a buffer x 100 and the BAX protein contained in the cellular lysate is measured by the ELISA sandwich technique.

/8

### ELISA sandwich:

- Dilution to 1/200 of the anti-bax monoclonal antibody in a carbonate-bicarbonate buffer, pH: 9.6
- Distribution of the antibody solution in a microplate (96 wells) at 100 µL/well
- Incubation overnight at 4°C (or one hour at 37°C)
- Removal of the supernatant
- Addition of the cellular lysate (100 µL/well) containing the BAX protein
- Incubation at room temperature for one hour
- Rinsing wells 3 times with 200 µL of PBS buffer containing 0.1% Tween 20
- Addition of anti-bax antibody (100 µL/well)

- Incubation one hour at room temperature
- Rinsing 3 times with 200  $\mu$ L PBS buffer containing 0.1% Tween 20
- Addition of a solution of second rabbit anti-IgG antibody couples to peroxidase (50  $\mu$ L/well)
- Incubation at room temperature for 1 hour
- Rinsing 3 times with 200  $\mu$ L of PBS buffer containing 0.1% Tween 20
- Addition of the substrate (50  $\mu$ L/well)
- Incubation at room temperature for 30 min
- Addition of 10  $\mu$ L/well of a solution of 1N sulfuric acid
- Reading the microplate at 450 nm with the aid of a microplate reader (METERTECH).

Measurement of BAX by the ELISA sandwich method:

The values are expressed in optical density (O.D.) (optical density of the BAX protein), visualizing is done by peroxidase.

/9

(As indicated previously the active fraction (F.A.) is eluted between 0 and 20 min, 25 and 35 min and 40 and 50 min by semipreparative HPLC on the diol grafted silica support. The eluant is hexane/isopropanol 95/5.

The inactive fraction (FNA) is eluted between 20 and 25 min and 35 and 40 min.

Table I: Measurement of BAX on a culture of human keratinocytes\*

							moyenne (B) (D.O)	écart (C) type	
(A) témoin	(D)	(1)	0,166	0,219	0,196	0,198	0,194	0,195	0,019
FNA : 20-25 et 35-40 min		(2)	0,142	0,206	0,190	0,190	0,201	0,186	0,025
FA : 0-20, 25-35 et 40-50 min	(D)	(3)	0,095	0,101	0,094	0,110	0,107	0,101	0,007

Key: A Control  
B Mean (O.D.)  
C Standard deviation  
D and

(1) and (2): difference not statistically significant:  $p = 58.43\%$

\* [In tables and figures, commas in numbers represent decimal points]



(1) and (3): difference statistically significant:  $p < 10^{-5}$

The addition of the active fraction containing the biologically active substances of the invention in the culture enables clear inhibition of BAX synthesis.

Table II: Measurement of BAX by ELISA sandwich synthesized by the fibroblasts

Table II illustrates the effect of the active fractions (FA) containing one or more biological substances active on the expression of the BAX protein synthesized by human fibroblasts derived from surgical explants originating from individuals of different ages obtained by the standard technique.

Number of identical cells in each experiment, and cells with the same number of passages.

Measurement of BAX by the ELISA sandwich method: expression of the values in O.D., visualizing by peroxidase.

							moyenne Ⓐ(D.O)	écart Ⓑtype	
Ⓒ	5 ans non traité	(1)	0,049	0,049	0,047	0,052	0,075	0,054	0,012
Ⓓ	5 ans traité avec F.A.	(2)	0,064	0,053	0,050	0,060	0,051	0,056	0,006
Ⓔ	61 ans non traité	(3)	0,149	0,136	0,132	0,141	0,130	0,138	0,008
Ⓕ	61 ans traité avec F.A.	(4)	0,081	0,069	0,063	0,080	0,060	0,071	0,010

Key: A Mean (O.D.)  
 B Standard deviation  
 C 5 years not treated  
 D 5 years treated with FA  
 E 61 years not treated  
 F 61 years treated with FA

/10

(1) and (2): difference not statistically significant

(1) and (4): difference not statistically significant

(FA): the concentration of the active fraction is 1% (cultures of fibroblasts are treated with 1% of an ethanol solution containing the active ingredient).

Table II is illustrated by Figure 1.

The synthesis of BAX increases with age. The treatment of cells by a 1% solution of active fraction lowers the production of the BAX protein to a level near that observed with cells originating from a young subject.

Table III: Measurement of BAX by ELISA sandwich synthesized by keratinocytes

Table III illustrates the effect of the active fraction (FA) containing one or more biological substances active on the expression of the bax protein synthesized by human keratinocytes derived from surgical explants originating from individuals of different ages.

Number of identical cells ( $10^6$  cells) in each experiment, and cells with the same number of passages (P1).

Measurement of bax by the ELISA sandwich method: expression of the values in O.D., visualizing by peroxidase after 48 h or incubation.

The concentration in active fractions is 1%.

					(A) moyenne (D.O)	(B) écart type	
(C)	5 ans témoin	(1)	0,376	0,313	0,288	0,326	0,045
(D)	5 ans traité avec F.A.	(2)	0,321	0,286	0,251	0,286	0,035
(E)	42 ans témoin	(3)	0,471	0,419	0,386	0,425	0,043
(F)	42 ans avec F.A.	(4)	0,342	0,316	0,293	0,317	0,025
(G)	61 ans témoin	(5)	0,629	0,562	0,512	0,568	0,059
(H)	61 ans avec F.A.	(6)	0,467	0,419	0,355	0,414	0,056
(I)	Vérification $\mu$		0,434	0,386	0,348	0,389	

Key: A Mean (O.D.)  
 B Standard deviation  
 C 5 years control  
 D 5 years treated with FA  
 E 42 years control  
 F 42 years with FA  
 G 61 years control  
 H 61 years with FA  
 I Verification  $\mu$

- (1) and (2): difference = -0.040  
variation (%) = -12.18
- (3) and (4): difference = -0.108  
variation (%) = -25.47
- (5) and (6): difference = -0.154  
variation (%) = -27.13

Table III is illustrated with Figures 2 and 3. The synthesis of BAX by keratinocytes increases with age, and in the presence of the active fraction (FA) the latter is decreased.

The synthesis of BAX increases with age. The treatment of cells by a 1% solution of active fraction lowers the production of the BAX protein to a level near that observed with cells originating from a young subject.

The older the cell, the more effective is the treatment by the active fractions on the keratinocytes.

### Example II

Study of the synthesis of the BAX protein in the presence of free radicals

The free radicals produced in this experiment are obtained by xanthine-xanthine oxidase.

Table IV: The free radicals stimulate the synthesis of the BAX protein

					① moyenne (D.O)	② écart type	
③	5 ans témoin	(1)	0,376	0,313	0,288	0,326	0,045
④	5 ans HX-XO	(2)	0,466	0,448	0,410	0,441	0,029
⑤	42 ans témoin	(3)	0,471	0,419	0,386	0,425	0,043
⑥	42 ans HX-XO	(4)	0,485	0,494	0,432	0,470	0,034
⑦	61 ans témoin	(5)	0,629	0,562	0,512	0,568	0,059
⑧	61 ans HX-XO	(6)	0,613	0,619	0,552	0,595	0,037

Key: A Mean (O.D.)  
B Standard deviation  
C 5 years control  
D 5 years HX-XO  
E 42 years control  
F 42 years HX-XO  
G 61 years control

- (1) and (2): difference = 0.116  
variation (%) = 35.52
- (3) and (4): difference = 0.045  
variation (%) = 10.58
- (5) and (6): difference = 0.027  
variation (%) = 4.76

Table IV is illustrated by Figures 4 and 5.

The xanthine-xanthine oxidase reaction produces free radicals that stimulate the synthesis of bax by the keratinocytes. This stimulation is less strong in the old keratinocytes.

Table V: The addition of active fractions (FA) in the culture medium reestablishes normal synthesis of the BAX protein in the presence of free radicals.

					moyenne A (D.O)	écart B type	
C	5 ans HX-XO	(1)	0,466	0,448	0,410	0,441	0,029
D	5 ans HX-XO + F.A.	(2)	0,301	0,326	0,270	0,299	0,028
E	42 ans HX-XO	(3)	0,485	0,494	0,432	0,470	0,034
F	42 ans HX-XO + F.A.	(4)	0,332	0,305	0,293	0,310	0,020
G	61 ans HX-XO	(5)	0,613	0,619	0,552	0,595	0,037
H	61 ans HX-XO + F.A.	(6)	0,408	0,403	0,341	0,384	0,037

Key: A Mean (O.D.)  
B Standard deviation  
C 5 years HX-XO  
D 5 years HX-XO + FA  
E 42 years HX-XO  
F 42 years HX-XO + FA  
G 61 years HX-XO  
H 61 years HX-XO + FA

- (1) and (2): difference = -0.142  
variation (%) = -32.25
- (3) and (4): difference = -0.160

variation (%) = -34.09

(5) and (6): difference = -0.211

variation (%) = -35.43

Table V is illustrated by Figures 6 and 7.

The treatment with the active fractions (FA) of keratinocytes cultured in the presence of free radicals decreases the synthesis of the BAX protein. If this decrease is greater in the old cells, it is not very constant in relative value whatever the age of the cells.

/13

/14

### Claims

1. Procedure for obtaining biologically active substances characterized in that a plant from the family of the Dictyotales is subjected to drying and/or lyophilization, to grinding up, followed by one or more strippings of the plant material with an organic solvent chosen from the group formed by alkanols, ketones, short-chain alkanes, cycloalkanes, halogenated solvents, aromatic solvents, esters, ethers and the like to obtain an organic extract from the plant, the organic extract is dried by evaporation of the solvent, [and] the dry organic extract is purified by one or more purification steps carried out successively by liquid/liquid contacting, by low-pressure or high-pressure column chromatography, [and] by high performance liquid chromatography to obtain one or more active fractions of plants from the family of the Dictyotales demonstrating an anti-apoptotic action by decreasing cellular synthesis of proteins related to those of the BAX family.

2. Procedure for obtaining biologically active substances according to Claim 1 characterized in that the ratios used between the plant matter and the organic solvent are preferably 1 g of dry plant matter for 5 mL of solvent, and the contact times between the plant matter and the organic solvent are between 12 h and 5 days.

3. Procedure for obtaining biologically active substances according to Claims 1 and 2 characterized in that the organic solvent used is acetone.

4. Procedure for obtaining biologically active substances according to one of Claims 1 to 3 characterized in that the first purification step carried out by liquid/liquid contacting consists of taking up the dry acetone extract by a methanol/water mixture contacted with hexane, [and] then the hydromethanolic phase is contacted with ether.

5. Procedure for obtaining biologically active substances according to one of Claims 1 to 4 characterized in that the second purification step carried out by low-pressure column chromatography consists of eluting, the biologically active ether fraction by a chloroform/methanol gradient on a gel support of the Sephadex type, then by eluting a second residual fraction by rinsing the column with a chloroform/methanol mixture.

/15

6. Procedure for obtaining biologically active substances according to one of Claims 1 to 5 characterized in that the third purification step is carried out by semipreparative high performance liquid chromatography on a diol grafted silica support with a hexane/isopropanol eluant and in that the active fractions are eluted between 0 and 20 min, 25 and 35 min and/or 40 and 50 min.

7. The biologically active substances likely to be obtained according to the procedure of Claims 1 to 6 presenting an anti-apoptotic action by decreasing synthesis of proteins related to the BAX family.

8. Biologically active substances according to Claim 7 characterized in that in semipreparative high performance liquid chromatography on the diol grafted silica support and with a hexane/isopropanol eluant they present retention times between 0 and 20 min, 25 and 35 min and/or 40 and 50 min.

9. Pharmaceutical, cosmetic and/or dietary compositions presenting an anti-apoptotic action by decrease of the synthesis of the BAX protein, characterized in that they contain as active ingredient one or more biologically active substances likely to be obtained according to the procedure of one of Claims 1 to 6 in combination with or in mixture with an inert excipient or vehicle, nontoxic, [and] appropriate for proposed use, and possibly one or more active ingredients with complementary action.

10. Pharmaceutical, cosmetic and/or dietary compositions according to Claim 9 in which the inert excipient or vehicle is one that is suitable for administration by the digestive, parenteral, percutaneous or topical route.

/16

11. Use of biologically active substances likely to be obtained according to the procedure of one of Claims 1 to 6 with a view to production of compositions or depot formulations designed to prevent and/or treat disorders involving increased synthesis of BAX protein.

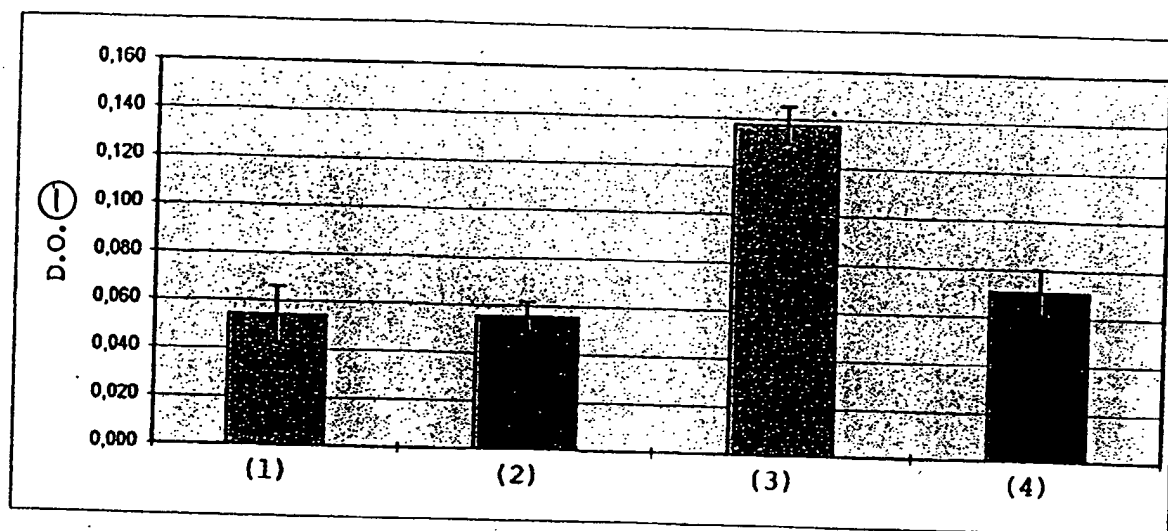


Figure 1

Key: 1 O.D.

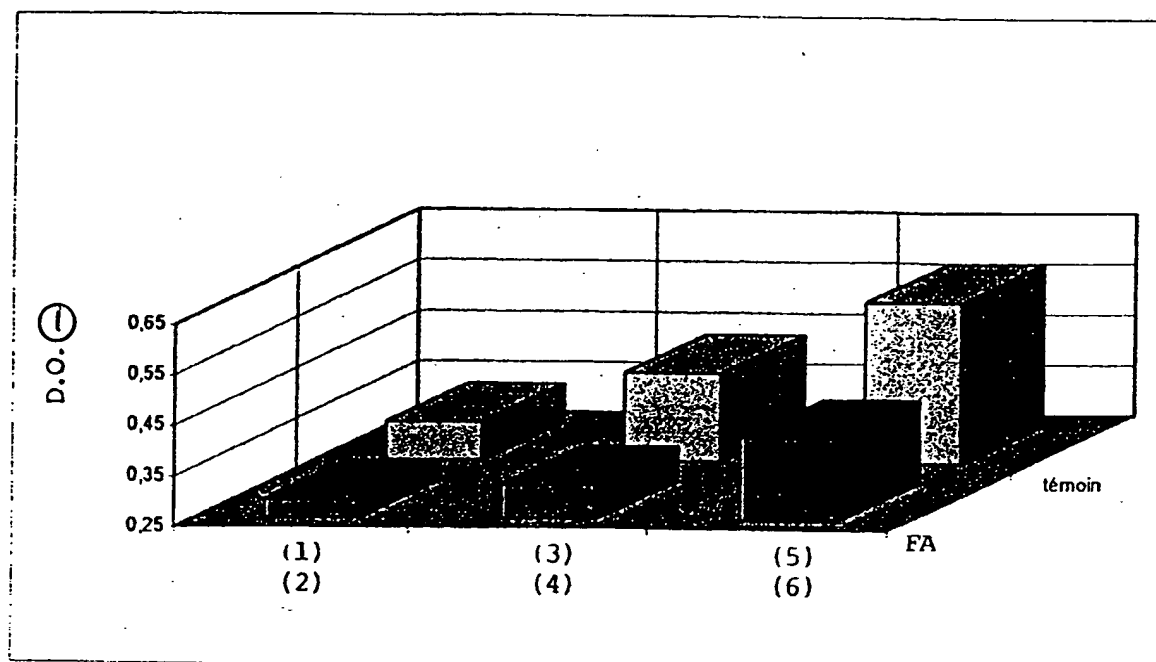


Figure 2

Key: 1 O.D.  
2 Control



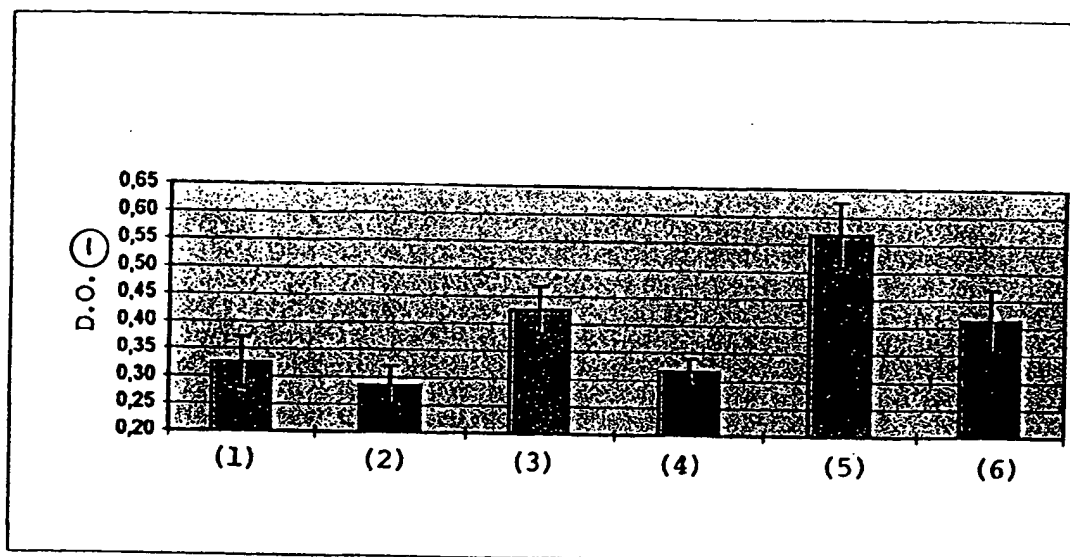


Figure 3

Key: 1 O.D.

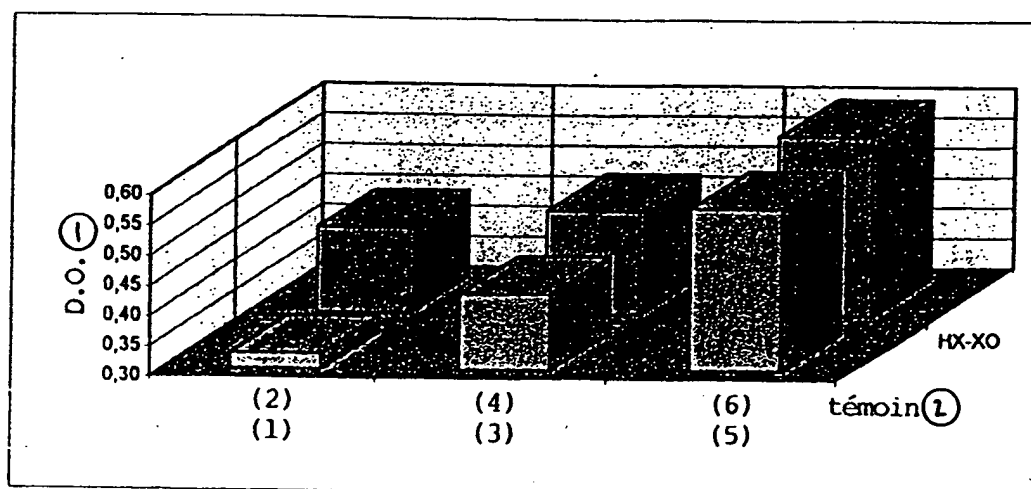


Figure 4

Key: 1 O.D.  
2 Control

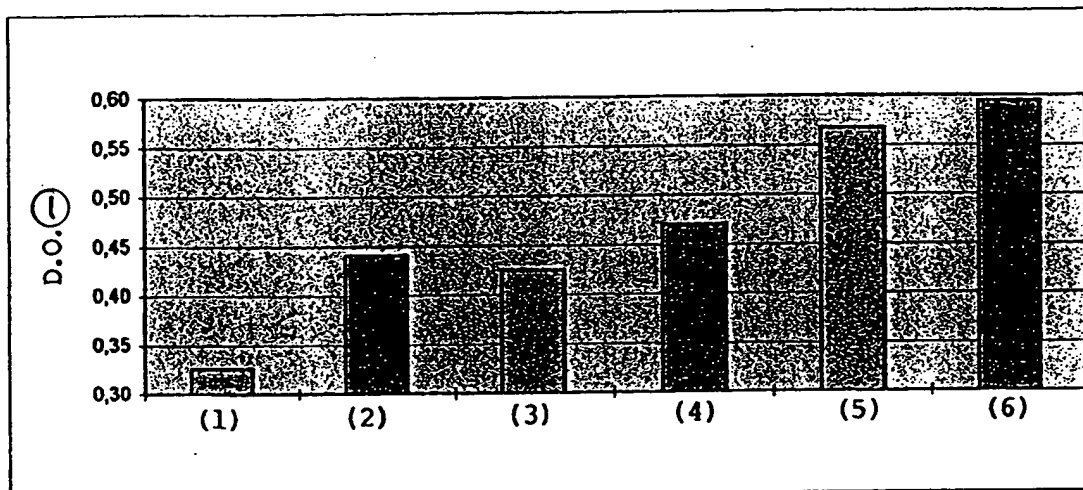


Figure 5

Key: 1 O.D.

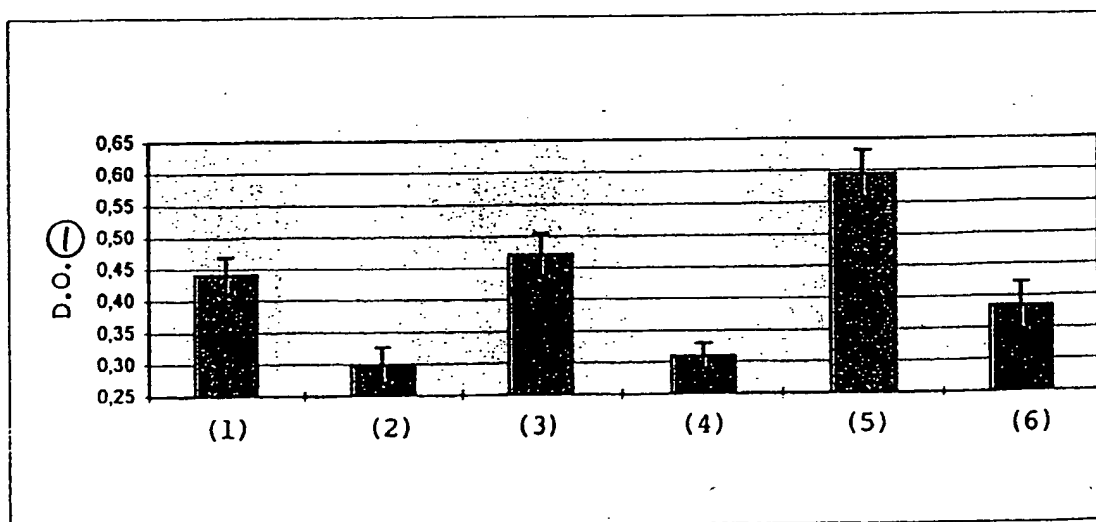


Figure 6

Key: 1 O.D.

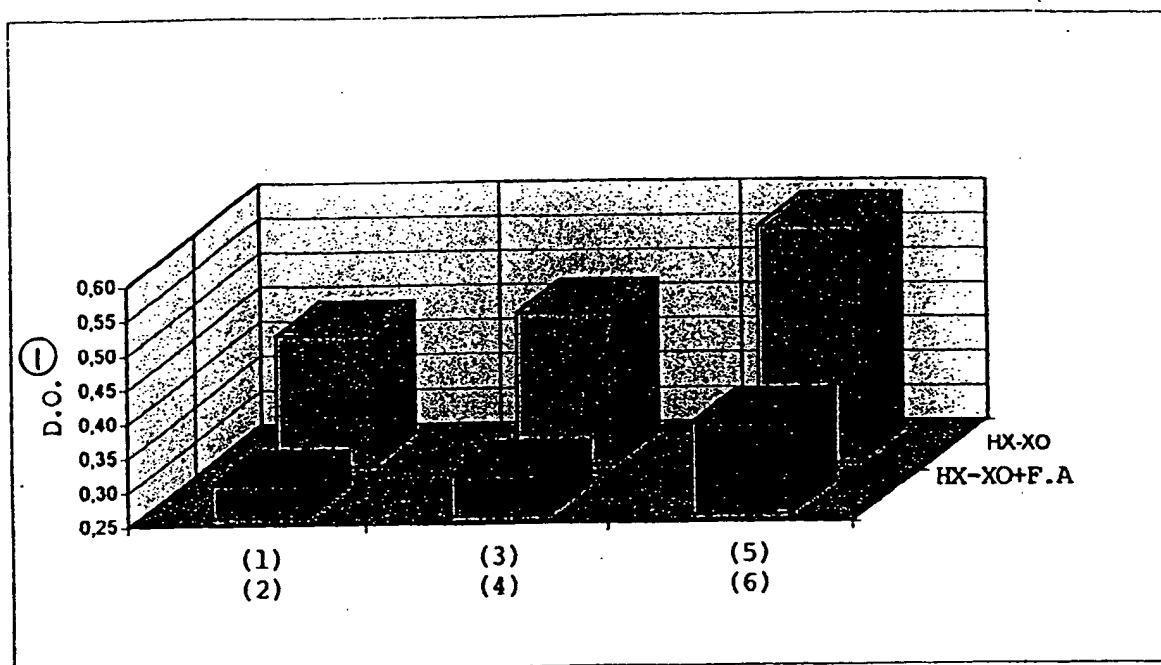


Figure 7

Key: 1 O.D.

FRENCH REPUBLIC  
National Institute  
of Industrial Property

Application Number  
FA 539610  
FR 9702506

**SEARCH REPORT**  
**established on the basis of the most**  
**recent claims filed before the start**  
**of the search**

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Claims concerned in the examined document	
Category	Citation of document with indication where appropriate, of relevant passages		
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 096, No. 002, February 29, 1996 & JP 07 285877 A (KAISOU SHIGEN KENKYUSHO:KK), October 31, 1995, * Abstract *	1	
X	--- V. KOSOVET ET AL.: "ALGAE AS POSSIBLE SOURCES OF ANTITUMORAL AGENTS." PHARMACOLOGICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 20, No. SUP V, 1988, pages 27-31, XP002048306 * The entire document *	1	
X	--- KYOKO HAYASHI ET AL.: "A SCREENING STRATEGY FOR SELECTION OF ANTI-HSV-1 AND ANTI-HIV EXTRACTS FROM ALGAE" PHYTOTHERAPY RESEARCH, Vol. 10, 1996, pages 233-237, XP002048307 * The entire document *	1	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. <sup>6</sup> ) A 61K
E	--- WO 97 25998 A (TEXINFINE S A ; LAPHAL LABORATOIRES SA (FR); GUTIERREZ GILLES (FR)) * page 1, line 5 – page 12, line 27 *	1-6,9-11	
Date of completion of the search November 27, 1997		Examiner Rempp, G	

**CATEGORY OF CITED DOCUMENTS**

X: Particularly relevant if taken alone.  
Y: Particularly relevant if combined with another  
document of the same category.  
A: Technological background.  
O: Non-written disclosure.  
P: Intermediate document.

T: Theory or principle underlying the invention.  
E: Earlier patent document, but published on, or after  
the filing date.  
D: Document cited in the application.  
L: Document cited for other reasons.  
.....  
&: Member of the same patent family, corresponding  
document.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 760 192

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

97 02506

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : A 61 K 35/80, A 61 K 7/48

⑫

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.03.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 04.09.98 Bulletin 98/36.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INOVAT — TN.

⑦2 Inventeur(s) : GUTIERREZ GILLES, NOTE DRUON  
et VIORNERY LIONEL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : GEFIB.

⑤4 PROCÉDE D'OBTENTION DE NOUVELLES SUBSTANCES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES, LES SUBSTANCES  
AINSI OBTENUES ET LES COMPOSITIONS EN REFERMANT.

⑤7 La présente invention a pour objet un procédé d'ob-  
tention de nouvelles substances biologiquement actives  
d'origine marine, les substances biologiquement actives  
ainsi obtenues et les compositions en renfermant.

Le procédé d'obtention de la présente invention est ca-  
ractérisé en ce que l'on soumet une plante de la famille des  
Dictyotales à un séchage, et/ou à une lyophilisation puis à  
un broyage, suivi d'un ou plusieurs épuisements de la ma-  
tière végétale par un solvant organique choisi dans le grou-  
pe formé des alcanols inférieurs, des cétones aliphatiques,  
des alcanes, des cycloalcanes, des solvants halogénés,  
des solvants aromatiques, des esters, des éthers et simi-  
laires, pour obtenir un extrait organique de la plante, on sèche  
l'extrait organique par évaporation du solvant, on purifie  
l'extrait organique sec par une ou plusieurs étapes de puri-  
fication réalisées successivement par affrontement liquide/  
liquide, par chromatographie sur colonne basse pression ou  
haute pression, par chromatographie liquide haute perfor-  
mance, pour obtenir une ou plusieurs fractions actives des  
plantes de la famille des Dictyotales manifestant une action  
anti apoptotique par diminution de la synthèse des protéines  
apparentées à celles de la famille de BAX.

Les substances biologiquement actives de l'invention

sont utilisées en vue de la réalisation de compositions ou de  
formulations dépôt destinés à prévenir ou à traiter les affec-  
tions impliquant une synthèse accrue des protéines appa-  
rentées à celles de la famille de BAX.



**PROCEDE D'OBTENTION DE NOUVELLES SUBSTANCES  
BIOLOGIQUEMENT ACTIVES, LES SUBSTANCES AINSI  
OBTENUES ET LES COMPOSITIONS EN RENFERMANT**

5 La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de nouvelles substances biologiquement actives d'origine marine, les substances biologiquement actives ainsi obtenues et les compositions en renfermant.

Ces nouvelles substances biologiquement actives sont extraites de plantes de la famille des Dictyotales.

10

Les compositions de la présente invention sont destinées à inhiber le programme de mort cellulaire des cellules d'eucaryotes, en diminuant la synthèse de la protéine BAX. Ces compositions manifestent ainsi une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse de la protéine BAX.

15

La découverte du phénomène de mort programmée, bien que non récente a fait une avancée importante ces dernières années grâce à l'immunologie et la biologie moléculaire qui mettent à la disposition des chercheurs, des anticorps et des antigènes objectivant les différents intervenants de l'apoptose. Aujourd'hui les principales étapes de l'apoptose sont relativement bien connues. La plupart des travaux sur l'arrêt du programme de mort sont tous conduits par l'amplification génomique des gènes codant les séquences peptidiques impliquées dans le développement de l'apoptose.

20

25 L'apoptose est régulée par deux familles de molécules de nature protéique appelées BAX et Bcl2. Ces molécules ne sont actives que lorsqu'elles sont accouplées. Le couple hétérodimère : protéines venant de deux familles différentes comme BAX-Bcl2 annule ce programme de mort. Le couple homodimère du type bax-bax l'active. Par conséquent, si on diminue la synthèse de BAX, on  
30 augmentera la vie des cellules.

Les substances biologiquement actives de la présente invention interviennent en régulant la synthèse de BAX tout au long de la vie et en diminuant cette synthèse après une agression.

L'apoptose physiologique est essentielle à notre survie. Elle intervient dans notre morphogénèse et elle est l'un des phénomènes majeurs du développement de notre cerveau. Chez les insectes, l'apoptose est l'un des phénomènes biologique  
5 majeur qui met en place la métamorphose, chez d'autres animaux elle joue un rôle prépondérant lors de la mue. Chez les mammifères et d'autres espèces elle régule les phénomènes immunitaires.

Les plantes desquelles sont extraites les substances biologiquement actives de  
10 l'invention, sont des Phéophycées, classe des Fucophyceae, ordre des Dictyotales, famille des Dictyotaceae. Seuls quelques genres appartiennent à la famille des Dictyotales, il s'agit de Padina, Zonaria ou Dictyota. Le genre Padina regroupe les espèces les plus fréquentes. A titre d'exemple, il est possible de trouver sur le rivage de la Méditerranée les espèces pavonica, boyana (*P. tenuis*), boergesenii,  
15 sur les rives du Pacifique (non repris les espèces déjà citées) : arborescens, australis, boryana, caulens, commersonii, concrescens, crasse, durvillei, elegans, fernandeziana, fraseri, gymnospora, de même sur les rives de l'Océan Atlantique : glabra, haitensis, distromatica, dubia. Il existe aussi des espèces typiques de l'océan Indien. L'une des caractéristiques de ces plantes est de fixer sur leur thalle  
20 une couche de carbonate de calcium de type aragonite ou orthorhombique à la surface des frondes. Cette caractéristique est obtenue par l'examen en diffraction X de la poudre obtenue avec ces plantes. La diffraction des rayons X montre que la poudre de ces plantes présente des pics d'intensité notable aux angles  $2\theta$  caractéristiques de l'aragonite.

25 Une autre caractéristique de ces plantes est leur capacité de survie dans des conditions difficiles en préservant leur propre vie végétative et non en utilisant la sporulation. Des mécanismes identiques à cette plante sont retrouvés dans nos cellules. En effet, ces algues étaient présentes au début de la construction de notre  
30 arbre d'évolution.

La présente invention concerne un procédé d'obtention des substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales.



Dans un premier temps, la plante de la famille des Dictyotales est soumise, après récolte, à un séchage, si possible à l'abri de la lumière, pour garder intactes ses propriétés pharmacologiques.

On procède au séchage des plantes broyées ou brutes, par ventilation sans chauffage et on obtient ainsi un matériel végétal de couleur marron foncé sur lequel contrastent vivement les stries blanches de carbonate de calcium.

Une autre méthode, bien que moins économique, donne également satisfaction : elle consiste à égoutter fortement les plantes, puis à les sécher sous vide d'air. La lyophilisation de la plante, broyée ou non, permet d'une manière avantageuse d'obtenir un produit anhydre.

Ces deux dernières techniques donnent un matériel de couleur vert brun foncé, très fragile et facilement réduit en poudre, ce qui facilite l'extraction par un solvant pour obtenir les substances biologiquement actives de l'invention.

L'intérêt d'une plante fortement séchée est d'obtenir une matière végétale qui se conserve bien (à l'abri de l'humidité) et à partir de laquelle il sera possible d'extraire la ou les substances actives, stabilisée(s) ou non, sans être gêné par la présence d'un solvant polaire. De plus, les plantes complètement séchées sont plus faciles à réduire en poudre.

Le procédé d'obtention des substances biologiquement actives est caractérisé en ce que l'on soumet une plante de la famille des Dictyotales à un séchage, et/ou à une lyophilisation, à un broyage, suivi d'un ou plusieurs épuisement de la matière végétale par un solvant organique choisi dans le groupe formé des alcanols (éthanol...), des cétones (acétone...), des alcanes à chaînes courtes (pentane, hexane, heptane...), des cycloalcanes (cyclohexane...), des solvants halogénés (chloroforme, dichlorométhane...), des solvants aromatiques, des esters (acétate d'éthyle...), des éthers et similaires, pour obtenir un extrait organique de la plante, on sèche l'extrait organique par évaporation du solvant, on purifie l'extrait organique sec par une ou plusieurs étapes de purification réalisées successivement par affrontement liquide/liquide, par chromatographie sur colonne basse pression ou haute pression, par chromatographie liquide haute performance, pour obtenir une ou plusieurs fractions actives des plantes de la famille des

Dictyotales manifestant une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse des protéines apparentées à celles de la famille de BAX par les cellules.

5 Les solvants organiques peuvent être utilisés seul ou en association. De manière générale, on peut utiliser des solvants organiques miscibles à l'eau, ainsi que tous les solvants susceptibles d'extraire les substances actives des frondes de la plante. Les solvants seront de préférence encore choisis parmi les solvants volatils dès lors que l'on désire obtenir des substances biologiquement actives débarrassées de solvant.

10

Le solvant organique sera de préférence l'acétone ou l'éthanol.

15 Lors de la macération, on a utilisé, avec de bons résultats, des rapports très variables de matière sèche par rapport au solvant. Les volumes mis en oeuvre pour une même quantité de matière sèche varient de 1 à 50. De même, les temps de contact entre le solvant organique et la matière végétale varient de 12 heures à 5 jours.

20 Dans le cas présent, la plante de la famille des Dictyotales une fois séchée, et/ou lyophilisée et broyée, est soumise à un ou plusieurs épuisements par la mise en contact de la plante avec de l'acétone, pendant 4 à 5 jours et dans les proportions de 1 gramme de matière végétale sèche pour 5 ml d'acétone.

25 L'extrait acétonique obtenu est séché par évaporation du solvant, puis purifié par les étapes de purification définies ci-après.

30 La première étape de purification est réalisée par affrontement liquide/liquide. Le résidu ou extrait sec acétonique est repris par un mélange méthanol/eau qui est affronté à de l'hexane. Dans un deuxième temps, la phase hydrométhanolique est affrontée, après concentration et dilution dans l'eau, à l'éther.

De cette manière, la phase étherée finale est biologiquement active.

La deuxième étape de purification est réalisée par chromatographie sur colonne basse pression. Le support utilisé est un gel de type Sephadex LH 20 ®.

L'élution s'effectue par un gradient chloroforme/méthanol. La fraction biologiquement active est éluée en chloroforme/méthanol dans les proportions 97/3 volume à volume. Lors du rinçage de la colonne par un mélange chloroforme/méthanol 70/30 on élue une deuxième fraction résiduelle.

5

L'étape suivante de purification a lieu par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi préparative. Les dimensions de la colonne sont de 250 mm de longueur et de 10 mm de diamètre. Le support utilisé est une silice greffée diol et l'éluant est un mélange hexane/isopropanol 95/5. Le débit est de 8 ml/min.

10 Les fractions actives sont éluées entre 0 et 20 min, 25 et 35 min et/ou 40 et 50 min. Les autres fractions sont rejetées ou utilisées à d'autres fins.

D'autres étapes de purification sont encore envisageable.

15 A l'issue de ces étapes de purification, on obtient une fraction biologiquement active constituée d'une ou plusieurs substances qui provoquent une diminution de la synthèse de BAX lors de la mise en contact avec des cellules.

Ainsi, les nouvelles substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales sont caractérisées en ce qu'elles présentent, lorsque les épuisements ont été effectués à l'acétone, des temps de rétention, en  
20 chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffé diol et avec un éluant hexane/isopropanol 95/5, compris entre 0 et 20 min, 25 et 35 min et/ou 40 et 50 min.

On procède ensuite à différentes méthodes analytiques (spectres UV, IR, RMN, chromatographie sur couche mince...) qui permettent la caractérisation de la ou  
25 des substances biologiquement actives, extraites dans ces conditions des plantes de la famille des Dictyotales.

La présente invention a encore pour objet les nouvelles substances biologiquement  
30 actives susceptibles d'être ainsi obtenues, extraites de plantes de la famille des Dictyotales.

Ces substances présentent une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse des protéines apparentées à celles de la famille de BAX, en particulier en présence de radicaux libres ou d'une élévation de température.

Ainsi les substances biologiquement actives permettent la stabilisation du phénomène de mort cellulaire induite dans les cellules souches, la prolongation de la vie cellulaire et la protection du « capital cellulaire ».

5

Les substances biologiquement actives selon l'invention, extraites de plantes de la famille des Dictyotales manifestent des propriétés pharmacologiques très intéressantes, et trouvent de ce fait un emploi en thérapeutique, en cosmétique, en alimentation, en diététique humaine et vétérinaire.

10 Les substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'invention sont utilisées en vue de la réalisation de compositions ou formulations dépôts destinés à prévenir et/ou à traiter les affections impliquant une synthèse accrue de la protéine BAX.

15 La présente invention concerne encore les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires présentant une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse de la protéine BAX, caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif une ou plusieurs substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'invention, en association  
20 ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, approprié à l'usage envisagé, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

Les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon  
25 l'invention sont destinées à l'administration par voie digestive, parentérale, percutanée ou topique. Les compositions sont donc présentées sous forme de comprimés nus ou enrobés, de dragées, de capsules, de gélules, de pilules, de tablettes, de cachets, de sirops, de poudres à ingérer ou à usage externe ; de solutés ou de suspensions conditionnés en ampoules ; de crèmes, de gels ou de  
30 pommades ; de solutions à usage percutané dans un solvant polaire pénétrant.

La présente invention concerne également les formulations dépôt présentant une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse de la protéine BAX, caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif une ou plusieurs

substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'invention, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, peu résorbable, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

5

Les exemples et résultats suivants illustrent l'invention. Ils ne la limitent en aucune façon.

### **EXEMPLE I**

#### **10 Etude de l'activité inhibitrice de la synthèse de la protéine BAX par les substances extraites de plantes de la famille des Dictyotales.**

Le critère d'activité admis est l'inhibition de la synthèse de la protéine BAX.

#### **15 Le dosage de BAX synthétisé par les kératinocytes est effectué par une méthode d'immuno absorption appelée ELISA sandwich.**

Les cellules sont préparées selon la technique de Germain et col., à partir de prélèvements de peaux saines provenant de chirurgie esthétique. Après élimination  
20 du tissu adipeux, la peau est coupée en petits fragments de 2 mm X 2 mm qui sont incubés dans une solution de thermolysine (500 µg/ml du tampon HEPES) à 37° C pendant 2 heures. L'épiderme est alors séparé facilement du derme à l'aide de pinces stériles très fines. Les lambeaux d'épiderme ainsi détachés sont incubés dans une solution de trypsine (0,05 % dans le tampon HBSS)-EDTA (0,1 % dans le  
25 tampon HBSS) à 37° C pendant 30 minutes afin de dissocier les kératinocytes. Après deux rinçages dans le tampon HBSS, les cellules kératinocytaires sont comptées à l'aide d'un Coulter Counter (Coultronics) puis mises en culture dans le milieu KMK (SIGMA).

#### **30 Protocole expérimental :**

Les kératinocytes fraîchement isolés sontensemencés à raison d'un million par boîte dans le milieu de culture KMK. Les cultures de kératinocytes sont traitées la veille avec 1 % d'une solution éthanolique contenant (boîtes essais) ou pas (boîtes témoins) le principe actif.

Le lendemain, les boîtes de culture sont mises dans un bain-marie à la température de 43° pendant 30 minutes. Elles sont ensuite transférées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> à 37° C pendant encore 2 heures. Les cellules sont alors lysées par un tampon X 100 et la protéine BAX contenue dans le lysat cellulaire est dosée

5 par la technique ELISA sandwich.

#### ELISA Sandwich :

- Dilution au 1/200 de l'anticorps monoclonal anti-bax dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH : 9,6.
- 10 • Distribution de la solution d'anticorps dans une microplaque (96 puits) à raison de 100 µl/puits.
- Incubation une nuit à 4° C (ou une heure à 37° C).
- Elimination du surnageant.
- Addition du lysat cellulaire (100 µl/puits) contenant la protéine BAX.
- 15 • Incubation à température ambiante pendant une heure.
- Rinçage des puits 3 fois avec 200 µl du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20.
- Addition de la solution d'anticorps anti-bax (100 µl/puits).
- Incubation une heure à température ambiante.
- 20 • Rinçage 3 fois avec 200 µl du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20.
- Addition d'une solution du second anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (50 µl/puits).
- Incubation à température ambiante pendant une heure.
- Rinçage 3 fois avec 200 µl du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20.
- 25 • Addition du substrat (50 µl/puits).
- Incubation à température ambiante pendant 30 min.
- Addition de 10 µl/puits d'une solution d'acide sulfurique 1 N.
- Lecture de la microplaque à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (METERTECH).

30

#### Dosage de BAX par la méthode d'ELISA sandwich :

Les valeurs sont exprimées en densité optique (D.O.) (densité optique de la protéine BAX), la révélation se fait par la peroxydase.

Comme indiqué précédemment la fraction active (F.A.) est éluée entre 0 et 20 min, 25 et 35 min et 40 et 50 min par HPLC semi-préparative sur support silice greffée diol. L'éluant est l'hexane/isopropanol 95/5.

La fraction non active (FNA) est éluée entre 20 et 25 min et 35 et 40 min.

5

**TABLEAU I** : Dosage de BAX sur une culture de kératinocytes humains.

						moyenne (D.O)	écart type	
témoin	(1)	0,166	0,219	0,196	0,198	0,194	0,195	0,019
FNA : 20-25 et 35-40 min	(2)	0,142	0,206	0,190	0,190	0,201	0,186	0,025
FA : 0-20, 25-35 et 40-50 min	(3)	0,095	0,101	0,094	0,110	0,107	0,101	0,007

(1) et (2) : différence non statistiquement significative :  $p = 58,43 \%$

10 (1) et (3) : différence statistiquement significative :  $p < 10^{-5}$

L'addition de la fraction active contenant les substances biologiquement actives de l'invention dans la culture, permet une nette inhibition de la synthèse de BAX.

15 **TABLEAU II** : Dosage de BAX par ELISA sandwich synthétisé par les fibroblastes.

Le tableau II illustre l'effet des fractions actives (FA) contenant une ou plusieurs substances biologiques actives sur l'expression de la protéine BAX synthétisée par des fibroblastes humains issus d'explants chirurgicaux provenant d'individus d'âges différents obtenus par la technique classique.

20

Nombre de cellules identique dans chaque expérimentation, et cellules au même nombre de passages.

Dosage de BAX par la méthode d'ELISA sandwich : expression des valeurs en D.O, révélation par la peroxydase.

25

							moyenne (D.O)	écart type
5 ans non traité	(1)	0,049	0,049	0,047	0,052	0,075	0,054	0,012
5 ans traité avec F.A.	(2)	0,064	0,053	0,050	0,060	0,051	0,056	0,006
61 ans non traité	(3)	0,149	0,136	0,132	0,141	0,130	0,138	0,008
61 ans traité avec F.A.	(4)	0,081	0,069	0,063	0,080	0,060	0,071	0,010

(1) et (2) : différence non statistiquement significative

(1) et (4) : différence non statistiquement significative

- 5 (FA) : la concentration de la fraction active est de 1 % (les cultures de fibroblastes sont traitées avec 1 % d'une solution éthanolique contenant le principe actif).

Le tableau II est illustré par la figure 1.

- 10 La synthèse de BAX augmente avec l'âge. Le traitement des cellules par une solution à 1 % de fraction active abaisse la production de la protéine BAX à un niveau voisin de celui observé avec des cellules provenant d'un sujet jeune.

- 15 **TABLEAU III** : Dosage de BAX par ELISA sandwich synthétisé par les kératinocytes.

- 20 Le tableau III illustre l'effet de la fraction active (FA) contenant une ou plusieurs substances biologiques actives sur l'expression de la protéine bax synthétisée par des kératinocytes humains issus d'explant chirurgicaux provenant d'individus d'âges différents.

Nombre de cellules identiques ( $10^6$  cellules) dans chaque expérimentation, et cellules ayant un même nombre de passages (P1).

Dosage de bax par la méthode ELISA sandwich : expression des valeurs en D.O. révélation par la peroxydase après 48 heures d'incubation.

25

La concentration en fractions actives est de 1 %.

					moyenne (D.O)	écart type
5 ans témoin	(1)	0,376	0,313	0,288	0,326	0,045
5 ans traité avec F.A.	(2)	0,321	0,286	0,251	0,286	0,035
42 ans témoin	(3)	0,471	0,419	0,386	0,425	0,043
42 ans avec F.A.	(4)	0,342	0,316	0,293	0,317	0,025
61 ans témoin	(5)	0,629	0,562	0,512	0,568	0,059
61 ans avec F.A.	(6)	0,467	0,419	0,355	0,414	0,056
Vérification $\mu$		0,434	0,386	0,348	0,389	



(1) et (2) : différence = -0,040  
variation (%) = -12,18

(3) et (4) : différence = -0,108

5 variation (%) = -25,47

(5) et (6) : différence = -0,154

variation (%) = -27,13

10 Le tableau III est illustré par les figures 2 et 3. La synthèse de BAX par les kératinocytes s'accroît avec l'âge, et en présence de la fraction active (F.A.) celle-ci est diminuée.

15 La synthèse de BAX augmente avec l'âge. Le traitement des cellules par une solution à 1 % de fraction active abaisse la production de la protéine BAX à un niveau voisin de celui observé avec des cellules provenant d'un sujet jeune.

Plus une cellule est âgée, plus le traitement par les fractions actives sont efficaces sur les kératinocytes.

## **EXEMPLE II**

20 **Etude de la synthèse de la protéine BAX en présence de radicaux libres.**

Les radicaux libres produits dans cette expérimentation sont obtenus par la xanthine xanthine-oxydase.

25 **TABEAU IV : Les radicaux libres stimulent la synthèse de la protéine BAX.**

					moyenne (D.O)	écart type
5 ans témoin	(1)	0,376	0,313	0,288	0,326	0,045
5 ans HX-XO	(2)	0,466	0,448	0,410	0,441	0,029
42 ans témoin	(3)	0,471	0,419	0,386	0,425	0,043
42 ans HX-XO	(4)	0,485	0,494	0,432	0,470	0,034
61 ans témoin	(5)	0,629	0,562	0,512	0,568	0,059
61 ans HX-XO	(6)	0,613	0,619	0,552	0,595	0,037

(1) et (2) : différence = 0,116

variation (%) = 35,52

(3) et (4) : différence = 0,045

variation (%) = 10,58

5 (5) et (6) : différence = 0,027

variation (%) = 4,76

Le tableau IV est illustré par les figures 4 et 5.

- 10 La réaction xanthine -xanthine oxydase produit des radicaux libres qui stimulent la synthèse de bax par les kératinocytes. Cette stimulation est moins forte sur les kératinocytes âgés.

TABLEAU V : L'addition des fractions actives (F.A.) dans le milieu de culture

- 15 rétablit une synthèse normale de la protéine BAX en présence de radicaux libres.

					moyenne (D.O)	écart type
5 ans HX-XO	(1)	0,466	0,448	0,410	0,441	0,029
5 ans HX-XO + F.A.	(2)	0,301	0,326	0,270	0,299	0,028
42 ans HX-XO	(3)	0,485	0,494	0,432	0,470	0,034
42 ans HX-XO + F.A.	(4)	0,332	0,305	0,293	0,310	0,020
61 ans HX-XO	(5)	0,613	0,619	0,552	0,595	0,037
61 ans HX-XO + F.A.	(6)	0,408	0,403	0,341	0,384	0,037

(1) et (2) : différence = -0,142

variation (%) = -32,25

- 20 (3) et (4) : différence = -0,160

variation (%) = -34,09

(5) et (6) : différence = -0,211

variation (%) = -35,43

- 25 Le tableau V est illustré par les figures 6 et 7.

Le traitement par les fractions actives (F.A.) des kératinocytes cultivés en présence de radicaux libres diminue la synthèse de la protéine BAX. Si cette diminution est

plus importante sur les cellules âgées, elle est à peu près constante en valeur relative quelque soit l'âge des cellules.

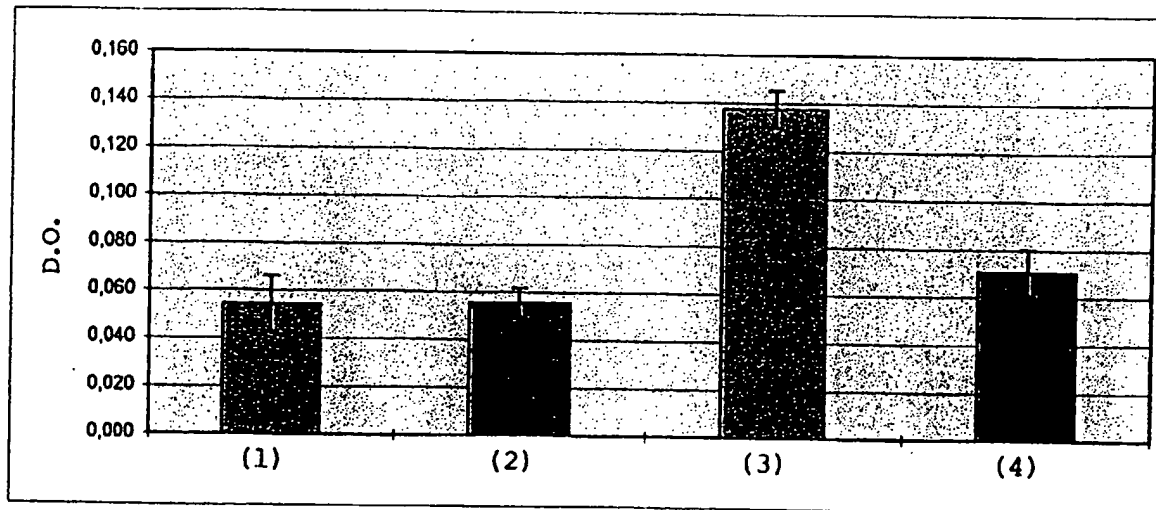
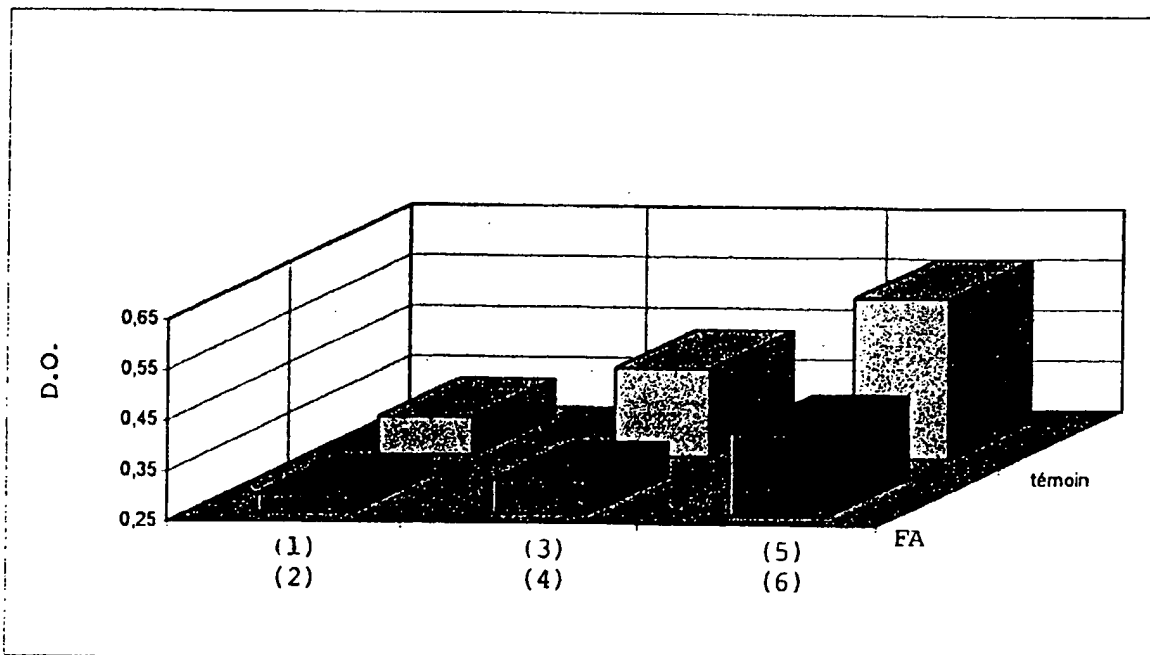
## REVENDECATIONS

1. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives, caractérisé en ce que l'on soumet une plante de la famille des Dictyotales à un séchage,  
5 et/ou à une lyophilisation puis à un broyage, suivi d'un ou plusieurs épuisements de la matière végétale par un solvant organique choisi dans le groupe formé des alcanols, des cétones, des alcanes à chaînes courtes, des cycloalcanes, des solvants halogénés, des solvants aromatiques, des esters, des éthers et similaires, pour obtenir un extrait organique de la plante, on  
10 sèche l'extrait organique par évaporation du solvant, on purifie l'extrait organique sec par une ou plusieurs étapes de purification réalisées successivement par affrontement liquide/liquide, par chromatographie sur colonne basse pression ou haute pression, par chromatographie liquide haute performance pour obtenir une ou plusieurs fractions actives des plantes de la  
15 famille des Dictyotales manifestant une action anti apoptotique par diminution de la synthèse des protéines apparentées à celles de la famille de BAX par les cellules.
2. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon la  
20 revendication 1, caractérisé en ce que les rapports utilisés entre la matière végétale et le solvant organique sont de préférence de 1 g de matière végétale sèche pour 5 ml de solvant, et les temps de contact entre la matière végétale et le solvant organique sont compris entre 12 heures et 5 jours.
- 25 3. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'on utilise en tant que solvant organique l'acétone.
- 30 4. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la première étape de purification, réalisée par affrontement liquide/liquide, consiste à reprendre l'extrait sec acétonique par un mélange méthanol/eau affronté à de l'hexane, puis la phase hydrométhanolique est affrontée à l'éther.

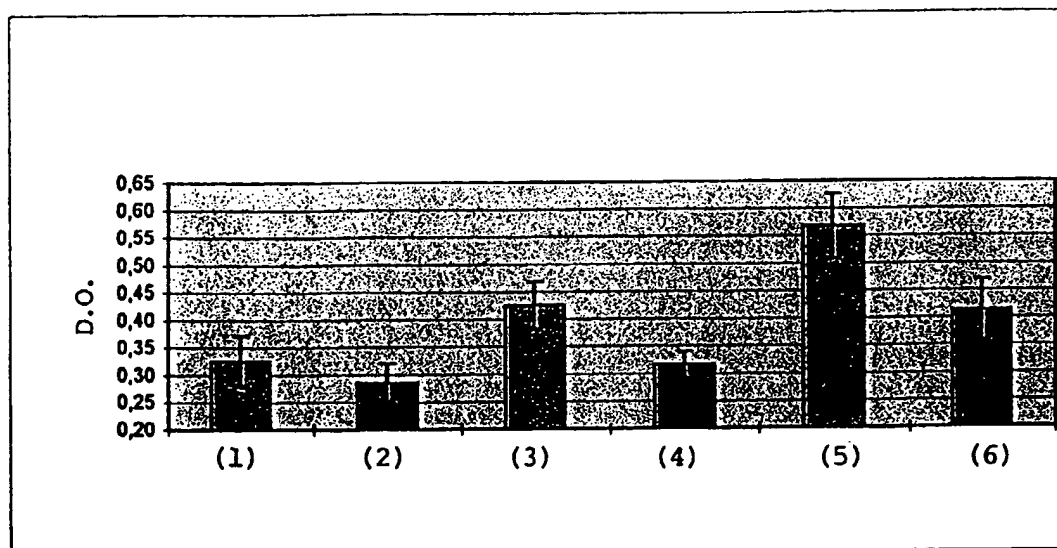
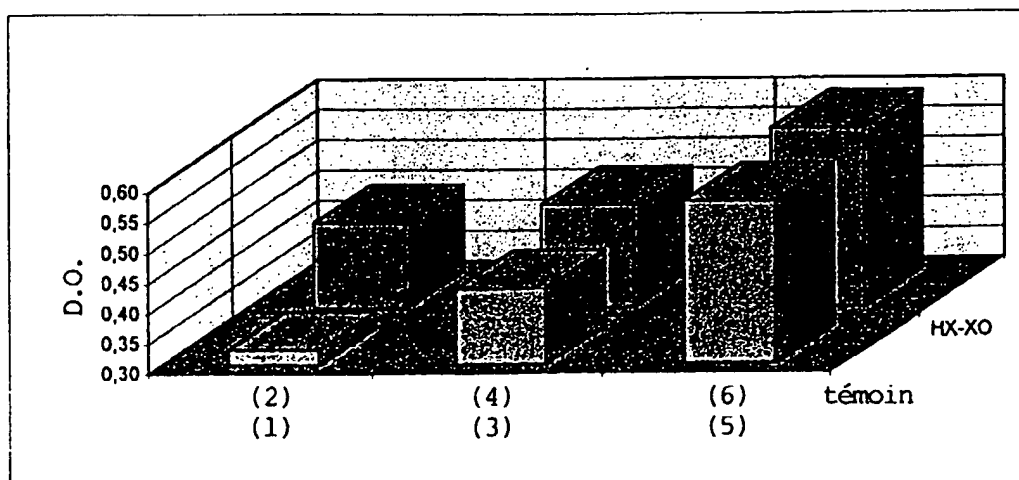
5. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la deuxième étape de purification, réalisée par chromatographie sur colonne basse pression, consiste à éluer, sur un support gel de type Sephadex, la fraction étherée biologiquement active par un gradient chloroforme/méthanol, puis à éluer une deuxième fraction résiduelle en rinçant la colonne par un mélange chloroforme/méthanol.
6. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la troisième étape de purification est réalisée par chromatographie liquide haute performance semi-préparative, sur un support silice greffée diol, avec un éluant hexane/isopropanol, et en ce que les fractions actives sont éluées entre 0 et 20 min, 25 et 35 min et/ou 40 et 50 min.
7. Les substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'une des revendications 1 à 6, présentant une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse des protéines apparentées de la famille BAX.
8. Substances biologiquement actives selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles présentent en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffé diol et avec un éluant hexane/isopropanol, des temps de rétention compris entre 0 et 20 min, 25 et 35 min et/ou 40 et 50 min.
9. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires présentant une action anti-apoptotique par diminution de la synthèse de la protéine BAX, caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif une ou plusieurs substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'une des revendications 1 à 6, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, approprié à l'usage envisagé, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

10. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon la revendication 9, dans lesquelles l'excipient ou le véhicule inerte est l'un de ceux qui conviennent pour l'administration par voie digestive, parentérale, percutanée ou topique.
- 5
11. Utilisation des substances biologiquement actives susceptibles d'être obtenues selon le procédé de l'une des revendications 1 à 6, en vue de la réalisation de compositions ou de formulations dépôt destinés à prévenir et/ou à traiter les affections impliquant une synthèse accrue de la protéine BAX.
- 10

1/4

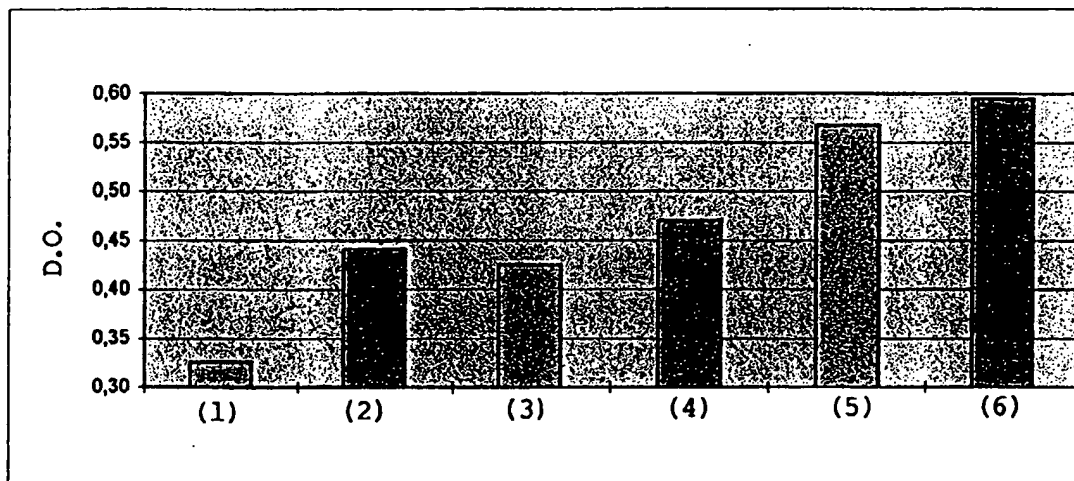
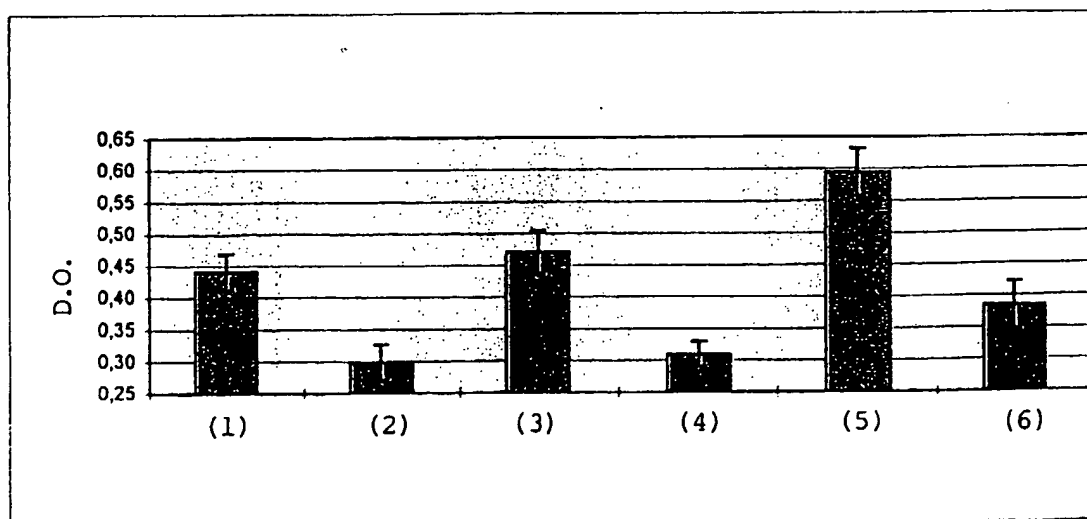
**Figure 1****Figure 2**

2/4

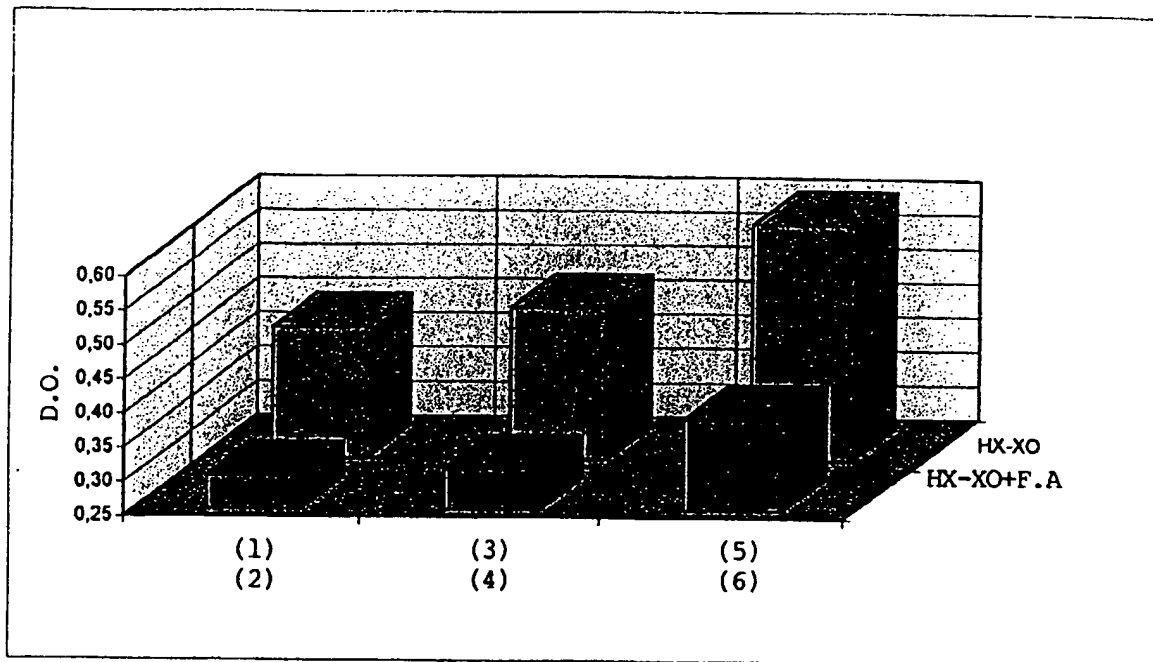
**Figure 3****Figure 4**



3/4

**Figure 5****Figure 6**

4/4

**Figure 7**

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL

d la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 539610  
FR 9702506

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 002, 29 février 1996 & JP 07 285877 A (KAISOU SHIGEN KENKYUSHO:KK), 31 octobre 1995, * abrégé *	1
X	--- V. KOSOVET ET AL.: "ALGAE AS POSSIBLE SOURCES OF ANTITUMORAL AGENTS." PHARMACOLOGICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 20, no. SUP V, 1988, pages 27-31, XP002048306 * le document en entier *	1
X	--- KYOKO HAYASHI ET AL.: "A SCREENING STRATEGY FOR SELECTION OF ANTI-HSV-1 AND ANTI-HIV EXTRACTS FROM ALGAE" PHYTOTHERAPY RESEARCH , vol. 10, 1996, pages 233-237, XP002048307 * le document en entier *	1
E	--- WO 97 25998 A (TEXINFINE S A ; LAPHAL LABORATOIRES SA (FR); GUTIERREZ GILLES (FR)) * page 1, ligne 5 - page 12, ligne 27 * -----	1-6,9-11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IntCL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 novembre 1997		Rempp, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

# Request Form for Translation

Translation Branch  
The world of foreign-prior art to you.



U. S. Serial No. : 09/914823

Requester's Name: Alycia Berman

Phone No. : 308-4638

Fax No. : \_\_\_\_\_

Office Location: CM1-3D12

Art Unit/Org. : 1617

Group Director: John Doll

Is this for Board of Patent Appeals? No

Date of Request: 5/29/02

Date Needed By: 6/29/02

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

## PTO 2002-3107

S.T.I.C. Translations Branch

Phone: 308-0881  
Fax: 308-0989  
Location: Crystal Plaza 3/4  
Room 2C01

### SPE Signature Required for RUSH:

### Document Identification (Select One):

\*\* (Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)\*\*

1. ☒ Patent Document No. 2760192  
Language French  
Country Code FR  
Publication Date 9/4/58  
No. of Pages \_\_\_\_\_ (filled by STIC)

2. ☐ Article Author \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_

3. ☐ Other Type of Document \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_

### Document Delivery (Select Preference):

☒ Delivery to nearest EIC/Office Date: 6-12-02 (STIC Only)  
☐ Call for Pick-up Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)  
☐ Fax Back Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?

Yes (Yes/No)

Will you accept an English abstract?

No (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?

No (Yes/No)

### STIC USE ONLY

#### Copy/Search

Processor: 111  
Date assigned: 6-3  
Date filled: 6-3  
Equivalent found: \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Doc. No.: \_\_\_\_\_

Country: \_\_\_\_\_

Remarks: \_\_\_\_\_

#### Translation

Date logged in: 6-3-02  
PTO estimated words: 5070  
Number of pages: 20  
In-House Translation Available: \_\_\_\_\_

#### In-House:

Translator: \_\_\_\_\_  
Assigned: \_\_\_\_\_  
Returned: \_\_\_\_\_

#### Contractor:

Name: me  
Priority: SE  
Sent: 6-8-02  
Returned: 6-12-02